

(19)日本国特許庁 (J P) (12)特許公報 (B 2)

(45)発行日 平成9年(1997)9月3日 (11)特許番号 第2649287号
(46)発明日 平成9年(1997)5月16日

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	内訳整理番号	F I	技術分野
A 01 H 4/00			A 01 H 4/00	技術分野
C 12 N 5/10			C 12 N 5/00	

(21)出願番号	特許番号	(72)発明者	請求項の数(全 13 頁)
(86) (22)出願日	平成5年(1983)7月6日	日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号	
(86) 国際出願番号	PCT/J P 93/00926	佐江井 祐弘	
(87) 国際公開番号	WO 94/00977	静岡県静岡市駿河区東原700 日本たばこ産業株式会社遺伝育種研究所内	
(87) 国際公開日	平成6年(1994)1月20日	小柳 敏彦	
(31) 優先権主張番号	特願平4-204464	静岡県静岡市駿河区東原700 日本たばこ産業株式会社遺伝育種研究所内	
(32) 優先日	平4(1992)7月7日	井理士 谷川 英次郎	
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	審査官 藤山 順	

(54) [発明の名称] 単子葉植物の形質転換方法

1
(57) [特許請求の範囲]
【請求項1】 所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る単子葉植物の形質転換方法。
【請求項2】 前記単子葉植物がイネ科植物である請求項1記載の方法。
【請求項3】 前記単子葉植物がイネである請求項1記載の方法。
【請求項4】 前記単子葉植物がトウモロコシである請求項1記載の方法。
【請求項5】 前記アグロバクテリウム属細菌は、TiまたはRiプラスミドを持つアグロバクテリウム属細菌であって、*Agrobacterium tumefaciens*のTiプラスミドpTiBo542のグニルレンス領域由来のDNA断片を含むプラスミドを

2
導入したアグロバクテリウム属細菌である請求項1ないし4いずれか1項に記載の方法。
【請求項6】 前記DNA断片を含むプラスミドはpROK102又はその誘導体である請求項5記載の方法。
【請求項7】 前記アグロバクテリウム属細菌は、*Agrobacterium tumefaciens*である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項8】 形質転換操作に用いるアグロバクテリウム属細菌の菌体濃度が 10^8 細胞/mlである請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
【請求項9】 前記培養組織を酵素処理や加圧など

形質転換組織を選抜する請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 前記脱分化過程にある培養組織は、外植体を脱分化経路で選抜後7日以上のカルス形成過程にある培養組織である請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。
【請求項12】 前記培養組織が単子葉植物の体細胞由来の培養組織である請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 培養組織が正常な個体を再生する能力を有する組織である請求項1ないし12のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

背景技術

単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法 (PEG法)、パーデイクランゲン法その他が知られている。

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し、形質転換を図る方法である。現在、最も再現性のある手法で、この方法で種々の遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている (Torii

et al., 1989; Science 240:204-207)。しかしながら、この方法は、1) プロトプラストからの個体再生系が確立されている植物種にのみ適用可能である、2) プロトプラストから個体再生までの数か月を要するので、形質転換体を得るのに時間がかかる、3) 培養期間が長期化する、4) それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常な形質転換体を得る確率が低くなる、という問題点を有する。

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激がPEGと変わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはるかに低いと考えられる。この方法で形質転換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様の問題点を持つ (Zhang W. et al., 1990; Bio/Technol. 8:736-740)。

パーティクルガン法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打ち込むことよって形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行うことができ、特に、プロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効である。形質転換効率は、通

伝子を打ち込んだ後の選抜に依存する。エレクトロポレーション法と効率を比較したデータはない (Condon-Kamm W.J. et al., 1990; Plant Cell 2:603-618; From M.E. et al., 1990; Bio/Technol. 8:833-839; Christou P. et al., 1991; Bio/Technol. 9:957-962)。

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養 (Torii R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139; Ledox L. et al., 1978; Nature 249:17-21)、2) 花粉管への処理 (Luo and Wu 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165)。

3) リポソーム法 (Caboche M. 1990; Physiol. Mol. Pl. 79:173-176; God A.E. et al., 1990:177-183) 及び 4) マイクロインジェクション法 (Neuhaus G. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36) があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言い難い。

一方、アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、サトウ等の双子葉植物の形質転換法として広く用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないとされている (De Clouet M. 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

アグロバクテリウム属細菌による単子葉植物の形質転換に関する研究はアスパラガス (Byrbenier B. et al., 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5345-5349)、そしてヤム (Dioscorea bulbifera) (Schaefer, et al., 1987; Nature 327:529-532) で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科植物にはこの方法を適用できないとされている (Potrykus I., 1990; Bio/Technol. 8:535-543)。

Grimsley et al., 1987; Nature 325:177-179はアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシトリックウイルス (Maize streak virus) のDNAを挿入したものをトウモロコシの生長点に接種したところ、トウモロコシトリックウイルスの感染を促進したことを報告している。トウモロコシトリックウイルスのDNAを接種した上ではこのような感染症状が認められないことから、上の観察結果はアグロバクテリウムがトウモロコシT-DNAを導入することのできることを示すものと解釈して

も、しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれても増殖する可能性がある。この結果はT-DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種した時よりも高くなる (Grimsley et al., 1988; Bio/Technol. 6:185-189)。

感染にはアグロバクテリウムのプラスミドのT-DNA運送子が必須であることを示した (Grimsley et al., 1989; Gen. Genet. 217:309-316)。

Gould J. et al., (1991; Plant Physiol. 95:426-434) はトウモロコシの茎頂に針で傷をつけた後カナマイシン抵抗性遺伝子と α -GS遺伝子を持った強病原性アグロバクテリウム (EM4) を接種し、処理後の茎頂組織をカナマイシン

ンで選抜したところ、低抵抗性を示す植物体を得た。この後、後の種子の一部は導入した遺伝子を持つことをサザン分析で確認した（キナシ現象）。

Money P.A. et al., (1991; Plant Cell, Tissue, Organ Culture 25: 209-218) は、アグロバクテリウムを用いて小葉の脈にカニマイニン低抵抗性遺伝子の導入を試み、まず、脈を消毒で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカニマイニン低抵抗性と思われるカルスが出現したが、このカルスからの植物体の再生はできなかった。また、カニマイニン低抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての低抵抗性カルスで導入遺伝子の増殖が認められた。

Ratner et al., (1990; Bio/Technol. 8: 33-38) は、イネの胚盤に傷をつけた後、強耐原性のアグロバクテリウムA281 (pTiBo542) をイネの8品種に処理したところ、日本晴、夢坂5号の2品種で腫瘍様の組織の増殖が見られた。さらに、T-DNAからホルモン合成遺伝子を除いたTiプラスミドにカニマイニン低抵抗性遺伝子とQ5遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカニマイニン低抵抗性カルスの増殖が見られた。この低抵抗性カルスではQ5遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNAがイネ細胞に導入されたと解釈している。

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能であることを示す研究報告が現れてきているが、まだ、再現性、導入効率、さらには遺伝子の導入の確率についても完全に納得できる結果を示しているとは言えない (Potrykus I., 1990; Bio/Technol. 8: 535-543)。

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法が主流であるが、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を要し、多大な労力がかかり、また長期間の培養により高純度の複製体が出現するという危険性がある。また、この方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、生長組織を用いることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。

しかし、生長点を単離する作業は多くの労力を要し、大量に調製することは必ずしも容易ではない。

発明の開示

従って、本発明の目的は、従来の方法と比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しては、もって適用的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

本発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子

葉の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバインナーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響を鋭意研究した結果、単子葉植物の培養組織をアグロバクテリウム菌体を用いて飛躍的に高い効率で形質転換することによって形質転換することができるとを見出し、これにより上記目的を達成することができると見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム菌体と単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供する。

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的の外来遺伝子を再現性よく導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでにもあるが、前述のとおり確立された方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用いられていない培養組織に本発明で改良した方法でアグロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発明の方法では、材料調製が容易なカルス等の培養組織を用いるので、生産点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることができ、また、培養組織を形質転換するので、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーバイナリーベクターを用いれば、一部のイネの品種のように培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入することが可能になった。さらに、後述の実施例に記載するように、適切な接種法を採用すれば、目的遺伝子がキメラ状に導入されるキメラ現象を低減させることもできる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム菌体に含まれるプラスミドの一例であるpTiOx62の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTiOx23の構築方法を示す図である。

本発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。

また、本発明の方法に供される培養組織は、単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織である。ここで、脱分化過程にある培養組織とは、外植体をオーキシン及びサイトカイニン等の植物生長調節物質を含む培地で培養することにより得られる組織で、カルス及び不定胚組織が形成される前段階の組織を意味し、脱分化した培養組織とは外植体をオーキシン及びサイトカイニン等の植物生長調節物質を含む培地で培養することにより得られるカルス及び不定胚組織を意味する。

本発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子

葉の植物組織は、いかなる部位由来のものであってもよい。例えば、胚盤、葉頂、幼根、未熟胚、花粉及び若果由来のものを挙げることができる。本発明で用いられる培養組織としては、脱分化過程にあり、細胞を凍結した後7日以上経過したカルス形成過程にある培養組織、又はカルス及び不定胚組織を培養することが好ましい。中でも、カルス及び不定胚組織を培養組織として用いることが最も好ましい。脱分化過程は、この分野において周知であり、例えばWeidlich (Ow.C.C., 1987; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press, Beijing, pp. 43-50) の主要無細胞培養及びビタミン類に2mM 2,4-D、3q/l カザミノ酸、30q/l ショ糖、2q/g ライトを添加した培地及び8日 (Linnsafer, E., and Skoog, F., 1965; Physiol. Plant 18: 100-127) の無細胞及びビタミン類に100mg/l カザミノ酸、700mg/l プロリン、1.5mg/l 2,4-D、20q/l ショ糖、2.3q/l グルタミンを添加した培地等を用いることができる。もっとも、本発明の方法に用いる培養組織は必ずしもカルスである必要はなく、細胞組織であってもよい。

形質転換に用いられるアグロバクテリウム菌体は、従来より単子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くはAgrobacterium tumefaciens由来のTiプラスミドのグニール領域 (vir領域) 由来のDNA領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする原質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入される。あるいは、このベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組織等に由来するTiプラスミド中にin vivoで挿入されるものである。また、本発明者らは、先に、Agrobacterium tumefaciens A281という強耐原性の、形質転換効率が極めて高い株 (Hood E.E. et al., 1984; Bio/Technol. 2: 702-709; Hood E.E. et al., 1986; J. Bacteriol. 158: 1283-1290; Konari T. et al., 1988; J. Bacteriol. 156: 88-94; Jin S. et al., 1987; J. Bacteriol. 159: 4417-4425; Konari T., 1989; Plant Science 60: 223-229; CC37394) に含まれるTiプラスミドpTiBo542 (Jin S. et al., 1987; J. Bacteriol. 159: 4417-4425) のグニール領域 (vir領域) 由来のDNA領域を含むベクター (本明細書において、このベクターを「スーパーバイナリーベクター」と呼ぶことがある) を開発した (特開平4-22327号)。このようにスーパーバイナリーベクターを本発明において好ましく用いることができる。このようなスーパーバイナリーベクターの例としてpTiOx62 (特開平4-22257号、欧州特許公開第504859号、米国特許公開第07/854,844号) を挙げることができる。その構造を図1に示す。このプラスミドは、大腸菌及びAgrobacterium tumefaciens中で増殖可能であるpTiOx54と呼ばれるプラスミド (Tiプラスミド) から誘導された公知のpOx472プラスミド (pOx472と呼ばれる公知の広宿主プラスミド) から後述の方法により構築された。Ti領域を含むプラスミド) とpTiBo542のグニール領域

域由来の既成クローニングされた上記5.2キロベースのKm耐性片 (virB, virC, virD, virE, virF, virG, virH, virI, virJ, virK, virL, virM, virN, virO, virP, virQ, virR, virS, virT, virU, virV, virW, virX, virY, virZ, viraa, virab, virac, virad, virae, viraf, virag, virah, virai, viraj, virak, viral, viram, viran, virao, virap, viraq, virar, viras, virat, virau, virav, viraw, virax, viray, viraz, virba, virbb, virbc, virbd, virbe, virbf, virbg, virbh, virbi, virbj, virbk, virbl, virbm, virbn, virbo, virbp, virbq, virbr, virbs, virbt, virbu, virbv, virbw, virbx, virby, virbz, virca, vircb, vircc, vircd, virce, vircf, vircg, virch, virci, vircj, virck, vircl, vircm, vircn, virco, vircp, vircq, vircr, vircs, virct, vircu, vircv, vircw, vircx, vircy, vircz, virda, virdb, virdc, virdd, virde, virdf, virdg, virdh, virdi, virdj, virdk, virdl, virdm, virdn, virdo, virdp, virdq, virdr, virds, virdt, virdu, virdv, virdw, virdx, virdy, virdz, virea, vir eb, vir ec, vir ed, vir ef, vir eg, vir eh, vir ei, vir ej, vir ek, vir el, vir em, vir en, vir eo, vir ep, vir eq, vir er, vir es, vir et, vir eu, vir ev, vir ew, vir ex, vir ey, vir ez, vir fa, vir fb, vir fc, vir fd, vir fe, vir ff, vir fg, vir fh, vir fi, vir fj, vir fk, vir fl, vir fm, vir fn, vir fo, vir fp, vir fq, vir fr, vir fs, vir ft, vir fu, vir fv, vir fw, vir fx, vir fy, vir fz, vir ga, vir gb, vir gc, vir gd, vir ge, vir gf, vir gg, vir gh, vir gi, vir gj, vir gk, vir gl, vir gm, vir gn, vir go, vir gp, vir gq, vir gr, vir gs, vir gt, vir gu, vir gv, vir gw, vir gx, vir gy, vir gz, vir ha, vir hb, vir hc, vir hd, vir he, vir hf, vir hg, vir hh, vir hi, vir hj, vir hk, vir hl, vir hm, vir hn, vir ho, vir hp, vir hq, vir hr, vir hs, vir ht, vir hu, vir hv, vir hw, vir hx, vir hy, vir hz, vir ia, vir ib, vir ic, vir id, vir ie, vir if, vir ig, vir ih, vir ii, vir ij, vir ik, vir il, vir im, vir in, vir io, vir ip, vir iq, vir ir, vir is, vir it, vir iu, vir iv, vir iw, vir ix, vir iy, vir iz, vir ja, vir jb, vir jc, vir jd, vir je, vir jf, vir jg, vir jh, vir ji, vir jj, vir jk, vir jl, vir jm, vir jn, vir jo, vir jp, vir jq, vir jr, vir js, vir jt, vir ju, vir jv, vir jw, vir jx, vir jy, vir jz, vir ka, vir kb, vir kc, vir kd, vir ke, vir kf, vir kg, vir kh, vir ki, vir kj, vir kk, vir kl, vir km, vir kn, vir ko, vir kp, vir kq, vir kr, vir ks, vir kt, vir ku, vir kv, vir kw, vir kx, vir ky, vir kz, vir la, vir lb, vir lc, vir ld, vir le, vir lf, vir lg, vir lh, vir li, vir lj, vir lk, vir ll, vir lm, vir ln, vir lo, vir lp, vir lq, vir lr, vir ls, vir lt, vir lu, vir lv, vir lw, vir lx, vir ly, vir lz, vir ma, vir mb, vir mc, vir md, vir me, vir mf, vir mg, vir mh, vir mi, vir mj, vir mk, vir ml, vir mm, vir mn, vir mo, vir mp, vir mq, vir mr, vir ms, vir mt, vir mu, vir mv, vir mw, vir mx, vir my, vir mz, vir na, vir nb, vir nc, vir nd, vir ne, vir nf, vir ng, vir nh, vir ni, vir nj, vir nk, vir nl, vir nm, vir nn, vir no, vir np, vir nq, vir nr, vir ns, vir nt, vir nu, vir nv, vir nw, vir nx, vir ny, vir nz, vir oa, vir ob, vir oc, vir od, vir oe, vir of, vir og, vir oh, vir oi, vir oj, vir ok, vir ol, vir om, vir on, vir oo, vir op, vir oq, vir or, vir os, vir ot, vir ou, vir ov, vir ow, vir ox, vir oy, vir oz, vir pa, vir pb, vir pc, vir pd, vir pe, vir pf, vir pg, vir ph, vir pi, vir pj, vir pk, vir pl, vir pm, vir pn, vir po, vir pp, vir pq, vir pr, vir ps, vir pt, vir pu, vir pv, vir pw, vir px, vir py, vir pz, vir qa, vir qb, vir qc, vir qd, vir qe, vir qf, vir qg, vir qh, vir qi, vir qj, vir qk, vir ql, vir qm, vir qn, vir qo, vir qp, vir qq, vir qr, vir qs, vir qt, vir qu, vir qv, vir qw, vir qx, vir qy, vir qz, vir ra, vir rb, vir rc, vir rd, vir re, vir rf, vir rg, vir rh, vir ri, vir rj, vir rk, vir rl, vir rm, vir rn, vir ro, vir rp, vir rq, vir rr, vir rs, vir rt, vir ru, vir rv, vir rw, vir rx, vir ry, vir rz, vir sa, vir sb, vir sc, vir sd, vir se, vir sf, vir sg, vir sh, vir si, vir sj, vir sk, vir sl, vir sm, vir sn, vir so, vir sp, vir sq, vir sr, vir ss, vir st, vir su, vir sv, vir sw, vir sx, vir sy, vir sz, vir ta, vir tb, vir tc, vir td, vir te, vir tf, vir tg, vir th, vir ti, vir tj, vir tk, vir tl, vir tm, vir tn, vir to, vir tp, vir tq, vir tr, vir ts, vir tt, vir tu, vir tv, vir tw, vir tx, vir ty, vir tz, vir ua, vir ub, vir uc, vir ud, vir ue, vir uf, vir ug, vir uh, vir ui, vir uj, vir uk, vir ul, vir um, vir un, vir uo, vir up, vir uq, vir ur, vir us, vir ut, vir uu, vir uv, vir uw, vir ux, vir uy, vir uz, vir va, vir vb, vir vc, vir vd, vir ve, vir vf, vir vg, vir vh, vir vi, vir vj, vir vk, vir vl, vir vm, vir vn, vir vo, vir vp, vir vq, vir vr, vir vs, vir vt, vir vu, vir vv, vir vw, vir vx, vir vy, vir vz, vir wa, vir wb, vir wc, vir wd, vir we, vir wf, vir wg, vir wh, vir wi, vir wj, vir wk, vir wl, vir wm, vir wn, vir wo, vir wp, vir wq, vir wr, vir ws, vir wt, vir wu, vir wv, vir ww, vir wx, vir wy, vir wz, vir xa, vir xb, vir xc, vir xd, vir xe, vir xf, vir xg, vir xh, vir xi, vir xj, vir xk, vir xl, vir xm, vir xn, vir xo, vir xp, vir xq, vir xr, vir xs, vir xt, vir xu, vir xv, vir xw, vir xx, vir xy, vir xz, vir ya, vir yb, vir yc, vir yd, vir ye, vir yf, vir yg, vir yh, vir yi, vir yj, vir yk, vir yl, vir ym, vir yn, vir yo, vir yp, vir yq, vir yr, vir ys, vir yt, vir yu, vir yv, vir yw, vir yx, vir yy, vir yz, vir za, vir zb, vir zc, vir zd, vir ze, vir zf, vir zg, vir zh, vir zi, vir zj, vir zk, vir zl, vir zm, vir zn, vir zo, vir zp, vir zq, vir zr, vir zs, vir zt, vir zu, vir zv, vir zw, vir zx, vir zy, vir zz, vir

域由来の既成クローニングされた上記5.2キロベースのKm耐性片 (virB, virC, virD, virE, virF, virG, virH, virI, virJ, virK, virL, virM, virN, virO, virP, virQ, virR, virS, virT, virU, virV, virW, virX, virY, virZ, viraa, virab, virac, virad, virae, viraf, virag, virah, virai, viraj, virak, viral, viram, viran, virao, virap, viraq, virar, viras, virat, virau, virav, viraw, virax, viray, viraz, virba, virbb, virbc, virbd, virbe, virbf, virbg, virbh, virbi, virbj, virbk, virbl, virbm, virbn, virbo, virbp, virbq, virbr, virbs, virbt, virbu, virbv, virbw, virbx, virby, virbz, virca, vircb, vircc, vircd, virce, vircf, vircg, virch, virci, vircj, virck, vircl, vircm, vircn, virco, vircp, vircq, vircr, vircs, virct, vircu, vircv, vircw, vircx, vircy, vircz, virda, virdb, virdc, virdd, virde, virdf, virdg, virdh, virdi, virdj, virdk, virdl, virdm, virdn, virdo, virdp, virdq, virdr, virds, virdt, virdu, virdv, virdw, virdx, virdy, virdz, vir ea, vir eb, vir ec, vir ed, vir ef, vir eg, vir eh, vir ei, vir ej, vir ek, vir el, vir em, vir en, vir eo, vir ep, vir eq, vir er, vir es, vir et, vir eu, vir ev, vir ew, vir ex, vir ey, vir ez, vir fa, vir fb, vir fc, vir fd, vir fe, vir ff, vir fg, vir fh, vir fi, vir fj, vir fk, vir fl, vir fm, vir fn, vir fo, vir fp, vir fq, vir fr, vir fs, vir ft, vir fu, vir fv, vir fw, vir fx, vir fy, vir fz, vir ga, vir gb, vir gc, vir gd, vir ge, vir gf, vir gg, vir gh, vir gi, vir gj, vir gk, vir gl, vir gm, vir gn, vir go, vir gp, vir gq, vir gr, vir gs, vir gt, vir gu, vir gv, vir gw, vir gx, vir gy, vir gz, vir ha, vir hb, vir hc, vir hd, vir he, vir hf, vir hg, vir hh, vir hi, vir hj, vir hk, vir hl, vir hm, vir hn, vir ho, vir hp, vir hq, vir hr, vir hs, vir ht, vir hu, vir hv, vir hw, vir hx, vir hy, vir hz, vir ia, vir ib, vir ic, vir id, vir ie, vir if, vir ig, vir ih, vir ii, vir ij, vir ik, vir il, vir im, vir in, vir io, vir ip, vir iq, vir ir, vir is, vir it, vir iu, vir iv, vir iw, vir ix, vir iy, vir iz, vir ja, vir jb, vir jc, vir jd, vir je, vir jf, vir jg, vir jh, vir ji, vir jj, vir jk, vir jl, vir jm, vir jn, vir jo, vir jp, vir jq, vir jr, vir js, vir jt, vir ju, vir jv, vir jw, vir jx, vir jy, vir jz, vir ka, vir kb, vir kc, vir kd, vir ke, vir kf, vir kg, vir kh, vir ki, vir kj, vir kk, vir kl, vir km, vir kn, vir ko, vir kp, vir kq, vir kr, vir ks, vir kt, vir ku, vir kv, vir kw, vir kx, vir ky, vir kz, vir la, vir lb, vir lc, vir ld, vir le, vir lf, vir lg, vir lh, vir li, vir lj, vir lk, vir ll, vir lm, vir ln, vir lo, vir lp, vir lq, vir lr, vir ls, vir lt, vir lu, vir lv, vir lw, vir lx, vir ly, vir lz, vir ma, vir mb, vir mc, vir md, vir me, vir mf, vir mg, vir mh, vir mi, vir mj, vir mk, vir ml, vir mm, vir mn, vir mo, vir mp, vir mq, vir mr, vir ms, vir mt, vir mu, vir mv, vir mw, vir mx, vir my, vir mz, vir na, vir nb, vir nc, vir nd, vir ne, vir nf, vir ng, vir nh, vir ni, vir nj, vir nk, vir nl, vir nm, vir nn, vir no, vir np, vir nq, vir nr, vir ns, vir nt, vir nu, vir nv, vir nw, vir nx, vir ny, vir nz, vir oa, vir ob, vir oc, vir od, vir oe, vir of, vir og, vir oh, vir oi, vir oj, vir ok, vir ol, vir om, vir on, vir oo, vir op, vir oq, vir or, vir os, vir ot, vir ou, vir ov, vir ow, vir ox, vir oy, vir oz, vir pa, vir pb, vir pc, vir pd, vir pe, vir pf, vir pg, vir ph, vir pi, vir pj, vir pk, vir pl, vir pm, vir pn, vir po, vir pp, vir pq, vir pr, vir ps, vir pt, vir pu, vir pv, vir pw, vir px, vir py, vir pz, vir qa, vir qb, vir qc, vir qd, vir qe, vir qf, vir qg, vir qh, vir qi, vir qj, vir qk, vir ql, vir qm, vir qn, vir qo, vir qp, vir qq, vir qr, vir qs, vir qt, vir qu, vir qv, vir qw, vir qx, vir qy, vir qz, vir ra, vir rb, vir rc, vir rd, vir re, vir rf, vir rg, vir rh, vir ri, vir rj, vir rk, vir rl, vir rm, vir rn, vir ro, vir rp, vir rq, vir rr, vir rs, vir rt, vir ru, vir rv, vir rw, vir rx, vir ry, vir rz, vir sa, vir sb, vir sc, vir sd, vir se, vir sf, vir sg, vir sh, vir si, vir sj, vir sk, vir sl, vir sm, vir sn, vir so, vir sp, vir sq, vir sr, vir ss, vir st, vir su, vir sv, vir sw, vir sx, vir sy, vir sz, vir ta, vir tb, vir tc, vir td, vir te, vir tf, vir tg, vir th, vir ti, vir tj, vir tk, vir tl, vir tm, vir tn, vir to, vir tp, vir tq, vir tr, vir ts, vir tt, vir tu, vir tv, vir tw, vir tx, vir ty, vir tz, vir ua, vir ub, vir uc, vir ud, vir ue, vir uf, vir ug, vir uh, vir ui, vir uj, vir uk, vir ul, vir um, vir un, vir uo, vir up, vir uq, vir ur, vir us, vir ut, vir uu, vir uv, vir uv, vir vw, vir vx, vir vy, vir vz, vir wa, vir wb, vir wc, vir wd, vir we, vir wf, vir wg, vir wh, vir wi, vir wj, vir wk, vir wl, vir wm, vir wn, vir wo, vir wp, vir wq, vir wr, vir ws, vir wt, vir wu, vir wv, vir ww, vir wx, vir wy, vir wz, vir xa, vir xb, vir xc, vir xd, vir xe, vir xf, vir xg, vir xh, vir xi, vir xj, vir xk, vir xl, vir xm, vir xn, vir xo, vir xp, vir xq, vir xr, vir xs, vir xt, vir xu, vir xv, vir xw, vir xx, vir xy, vir xz, vir ya, vir yb, vir yc, vir yd, vir ye, vir yf, vir yg, vir yh, vir yi, vir yj, vir yk, vir yl, vir ym, vir yn, vir yo, vir yp, vir yq, vir yr, vir ys, vir yt, vir yu, vir yv, vir yw, vir yx, vir yy, vir yz, vir za, vir zb, vir zc, vir zd, vir ze, vir zf, vir zg, vir zh, vir zi, vir zj, vir zk, vir zl, vir zm, vir zn, vir zo, vir zp, vir zq, vir zr, vir zs, vir zt, vir zu, vir zv, vir zw, vir zx, vir zy, vir zz, vir

13

ールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で2時間処理した後、青色の発色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組織数に対する百分率で表した。なお、選抜処理後得られた形質転換体と考えられる植物体でのQ5S活性の判定に際しては、植物体から葉片を採取し、同様な方法に従ってQ5S染色を行った。個体ごとの発現様式で、葉片全体又は葉片の切り口が一様に青色に呈色するものを陽性個体、キメラ状に呈色するものをキメラ個体とした。

(7) 形質転換細胞、組織の選抜

(i) 茎頂組織

5日間アグロバクテリウムと共存培養した茎頂組織を250mg/セフォキシムを含むMS培地で2週間培養し、生じた茎頂組織を40mg/ハイグロマイシンを含むMS培地に移植し、形質転換体の選抜を行った。

(ii) 胚盤

3日間共存培養した胚盤を250mg/セフォキシムを含むMS培地で1週間培養した後、50mg/ハイグロマイシンを含むMS培地で形質転換体の選抜を行った。

(iii) 培養組織 (胚盤カルス)

3日間共存培養した培養組織を、250mg/セフォキシムを含むMS培地で1週間培養した後、同培養組織を50mg/ハイグロマイシンを含むMS培地で3週間培養した(1)次選抜)。得られた低抗性組織をさらに50mg/ハイグロマイシンを含むMS-12培地 (MS無機塩類、MSビタミン類、2q/ガザミン、0.2mg/12-A-D、0.5mg/l 6BA、5mg/l ABA、30mg/lバビール、20q/ペンシ、2q/グルイト) で2〜3週間培養し、2次選抜)。この培地上で増殖したカルスを0、20、50mg/ハイグロマイシンを含む固体再生培地MS-3に移した。なお、共存培養後の30日地には全て250mg/セフォキシムを添加した。

(iv) 胚盤培養細胞

5日間共存培養した胚盤培養細胞を250mg/セフォキシムを含むMS培地で1週間培養した後、50mg/ハイグロマイシンを含むMS培地で形質転換体の選抜を行った。

のHind IIIサイトからしボーター配列の末端までのDNA領域の長さは、約1.4kbである(図1)。なお、サザン法についてはMolecular Cloning (Sambrook et al. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方法に従って行った。また、「月の光」の形質転換大世代の2系統について、Q5S陽性、Q5S陰性、ハイグロマイシン低抗性の各個体を2個体ずつ供試し、同様な手法によりサザン分析を行った。

(10) イネでの供試材料の違いによる遺伝子導入効率 (共存培養後におけるQ5S発現)

アグロバクテリウムが宿主植物の細胞に遺伝子を導入することが可能であることを確認するため、発育特性の異なる低抗性遺伝子とQ5S遺伝子を持つバイナリーベクター-pG121Hm (上述)を導入した樹をイネ品種月の光の様々な組織に処理し、共存培養後にQ5S活性を調査した。供試組織は茎頂、幼根、胚盤、幼根カルス、胚盤カルス及び胚盤培養細胞である。アグロバクテリウムで処理しなかった場合は、いずれの材料でも青色のQ5S発現を示すものは認められなかった。一方、アグロバクテリウムEHA101 (pG121Hm) で処理した場合には、幼根を除く組織でQ5Sの発現が確認された。処理組織数に対する青色を呈する組織の割合では胚盤カルスが最も高かった(表1)。さらに、Q5Sを発現する組織の大きさでも胚盤カルスが優れていた。胚盤カルスに次いで高い導入率を示した組織は茎頂であった。また、胚盤の脱分化組織である胚盤カルスおよび胚盤培養細胞で高い導入率を示したのに対し、胚盤では明らかに導入効率は低かった。このことは、より細胞分生の活性が高い組織に遺伝子が導入されやすいことを示唆するものである。

表1 供試材料の違いによるQ5S遺伝子の導入効率 (品種: 月の光)

供試組織	Q5S+の組織数/処理組織数(%)	処理組織に対するQ5S発現部位の大きさ	
		毎処理区	処理区
茎頂	0/20(0)	109/167(68)	##
幼根	0/20(0)	0/20(0)	+
幼根カルス	0/20(0)	24/115(21)	+
胚盤	0/50(0)	8/81(9)	+
胚盤カルス	0/141(0)	312/395(79)	##
胚盤培養細胞	0/232(0)	81/247(25)	+

+: 1%以下、+: 1〜10%、#: 10%以上

この実験で使用したバイナリーベクター-pG121HmではQ5S遺伝子のプロモーターの中にヒマワリのイントロンが挿入されているため、アグロバクテリウムの細胞の中ではQ5S遺伝子は発現しないことが確認されている(中村ら、1991)。以上のことから、共存培養後のQ5S遺伝子

の発現を指標とした場合、アグロバクテリウムはイネ細胞に遺伝子を導入することが確認された。

(11) 供試材料の違いによる形質転換組織および細胞の出現効率

共存培養処理を行った茎頂、胚盤、胚盤カルスおよび胚盤培養細胞を用いて、ハイグロマイシンによる形質転換組織および形質転換細胞の選抜を行った。その結果、胚盤カルスおよび胚盤培養細胞でハイグロマイシンに低抗性を示す形質転換細胞の割合が認められた(表2)。

また選抜された細胞は、Q5S遺伝子を一様に発現した。共存培養後、Q5S発現の調査で高い遺伝子導入率を示した茎頂組織は、ハイグロマイシンによる選抜の結果、全ての組織が枯死し、低抗性組織は得られなかった。茎頂は生息点を含む組織であるが、遺伝子の導入処理を行った後、低抗性組織が増えるためには、遺伝子が限られた生息点に導入される必要がある。アグロバクテリウムとの共存培養処理後、茎頂には多数の遺伝子が導入されているものの低抗性組織が得られなかったことは、生息点近傍に導入される確率が低いことによると考えられる。また、生長点近傍に遺伝子が導入され形質転換細胞が得られたとしても、得られた植物体がキメラ性を示す可能性が高いことは容易に推察された。これらのことから、Caull et al. (1991)により報告されている茎頂を用いた形質転換方法は、カルスなど脱分化組織を用いる方法に比べ、技術的な困難性が高く、再現性の低い手法であると考えられる。

完全無菌の胚盤に由来する培養組織である胚盤カルスや胚盤培養細胞の形質転換細胞が得られたのに対し、胚盤では低抗性細胞の増殖は認められなかった。また、Raineri et al. (1990)の方法に従い、傷をつけた胚盤を供試組織として遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入効率の向上はみられず、形質転換組織も得られなかった。これに対し、胚盤カルスを供試組織とした場合には、傷をつけるなどの処理も必要なく、再現性良く、しかも高効率で形質転換細胞が得られた。これらのことから、アグロバクテリウムによる形質転換の供試組織として、脱分化状態または脱分化過程にある培養組織が好適であると判断される。

13

16

19

22

25

28

31

34

37

40

43

46

49

52

55

58

61

64

67

70

73

76

79

82

85

88

91

94

97

100

103

106

109

112

115

118

121

124

127

130

133

136

139

142

145

148

151

154

157

160

163

166

169

172

175

178

181

184

187

190

193

196

199

202

205

208

211

214

217

220

223

226

229

232

235

238

241

244

247

250

253

256

259

262

265

268

271

274

277

280

283

286

289

292

295

298

301

304

307

310

313

316

319

322

325

328

331

334

337

340

343

346

349

352

355

358

361

364

367

370

373

376

379

382

385

388

391

394

397

400

403

406

409

412

415

418

421

424

427

430

433

436

439

442

445

448

451

454

457

460

463

466

469

472

475

478

481

484

487

490

493

496

499

502

505

508

511

514

517

520

523

526

529

532

535

538

541

544

547

550

553

556

559

562

565

568

571

574

577

580

583

586

589

592

595

598

601

604

607

610

613

616

619

622

625

628

631

634

637

640

643

646

649

652

655

658

661

664

667

670

673

676

679

682

685

688

691

694

697

700

703

706

709

712

715

718

721

724

727

730

733

736

739

742

745

748

751

754

757

760

763

766

769

772

775

778

781

784

787

790

793

796

799

802

805

808

811

814

817

820

823

表8 サザン親所による形質転換

表8 サザン親所による形質転換
体における導入遺伝子のコ
ピー数および形質転換次世
代における導入遺伝子の発
現(品種: 朝の光)

形質 転換 遺伝子 数	導入 遺伝子 コピー 数	次世代個体数			
		ハイグロマイシン感受性 低抗性	感受性	陽性	陰性
対照	—	0	60	0	20
1-2	2	30	0	19	1
2-1	2*	64	26	13	5
3-2	2	59	1	19	1

*2 コピーの導入遺伝子のうちの1つのは制限断片が
短く、導入遺伝子は不完全。

表9 サザン親所による形質転換

表9 サザン親所による形質転換
体における導入遺伝子のコ
ピー数および形質転換次世
代における導入遺伝子の発
現(品種: 月の光)

形質 転換 遺伝子 数	導入 遺伝子 コピー 数	次世代個体数			
		ハイグロマイシン感受性 低抗性	感受性	陽性	陰性
対照	—	0	60	0	20
1a	1	48	26	15	5
2a	2	33	18	13	5
2b	2	31	9	15	5
3	2	22	10	16	3
4a	3	22	21	13	7
4b	3	48	11	16	3
5a	3	26	13	17	3
5b	3	38	14	17	3
5c	3	24	9	17	2
6	2	47	13	20	14
7	1	56	20	14	5
8	4	45	22	—	—
9	1	52	18	18	2
10	4	53	10	—	—
11	2	75	15	18	2
12	3	44	7	14	6
13a	2	33	18	15	5
13b	2	32	8	13	7
14a	1	72	20	15	5
14b	1	28	14	10	10
15	1~2	22	7	12	8
16a	2	31	10	15	2
16b	2	32	8	14	3
16c*	2	69	24	13	7

T. and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15: 473-497. 0.1m

q/カニンチン, 1.0mq/カザミノ酸, 2.3q/グルライ
ト)に移植し、25℃、照明下で2~3日間培養した。そ
の後、25mq/セフタキシムを含む滅菌水で洗浄し、
同濃度のセフタキシムを含むLSI5個体培地で培養を続け
た。

(7) カルスへの接種、培養条件

カルスを前述のアグロバクテリウム懸濁液に約5日間
浸漬後、実施例1に示したアセトリンゴンを含む2N6
個体培地に移植し、25℃、暗黒下で3日間共存培養をお
こなった。その後カルスを25mq/セフタキシムを含
む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフタキシムおよび30mq
/ハイグロマイシンを含むLSI5個体培地で培養を続
け、系質転換カルスの選抜を行った。

(8) Q5活性の調査方法

共存培養処理直後の茎頂組織およびカルス、その後培
養を継続した茎頂組織およびカルスについて実施例1の
方法にともづきQ5活性を調査した。

(9) 茎頂組織への遺伝子導入

CouId5の報告 (CouId 3, et al. 1991; Plant Physio
1.95: 426-434) による生長点組織 (茎頂組織) を材料
とした形質転換が可能である事を確認するため、前述の
アグロバクテリウム菌系EHA101 (pG121m) を単離した
茎頂組織に処理し、生長した植物体でのQ5活性を調査
した。アグロバクテリウム非処理の組織では、いずれも
Q5遺伝子の発現はみられなかったが、アグロバクテリ
ウム処理した組織では針で穿刺した部分にQ5遺伝子の
発現が小さな点状に認められた。しかし、その後培養を
続け植物体でQ5活性を調査したところ、Q5遺伝子の
発現を示すものは全くなかった。生長点近傍は非常に微
細な組織であり、そこに穿刺アグロバクテリウムを感
染させることは容易でない。本実験の結果から生長点近
傍へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の
切り出し、穿刺などに熟練した技術が必要であると考え
られた。

表10 トウモロコシ茎頂組織

茎への遺伝子導入

実験 系統	供試組 数	茎頂の伸長 した組織数	得られた 植物体数	Q5発現のみの れた植物体数
1	24	9	2	0
2	16	8	6	0
3	17	13	5	0
4	14	1	0	0
5	45	14	7	0

供試組 数	茎頂の伸長 した組織数	得られた 植物体数	Q5発現のみの れた植物体数
6	32	14	8
7	30	7	1

供試品種はいずれもP3732

(10) トウモロコシの品種および供試品種による遺伝子
導入効率の違い

供試したいずれの品種でも高頻度でQ5遺伝子の発現
がみられた。EHA101 (pG121m) , LB4404 (pT0232)
の両系間で遺伝子発現効率の違いは認められなかった
(表10)。処理カルスに対するQ5染色部位の大きさも1
0%以上のものが多く、広範囲の組織で遺伝子発現が示
された。供試したアグロバクテリウムのハイグロマイ
シン-pG121mおよびpT0232はQ5遺伝子中にヒモのイント
ロンが介在しているため、アグロバクテリウムの細胞の
中ではQ5遺伝子が発現しない。このことから、トウモ
ロコシのカルスにおいて認められたQ5遺伝子の発現
は、アグロバクテリウムにより高頻度で遺伝子導入が行
われたことを示すものである。共存培養後、ハイグロマ
イシンを含む固体培地で培養することにより、供試カ
ルスの一部でコンバクトでこぶ状のカルスが増殖した。
増殖した組織はQ5遺伝子の発現を示したことから、形
質転換組織であると認められる。これらのコンバクトで
こぶ状の形質転換カルスはLupolitoの方法 (Lupolito,
E. and Lusardi, M. C. 1988; Maydica XXXII: 1163-1177) に
より再分化可能である。

表11 トウモロコシカルスへの

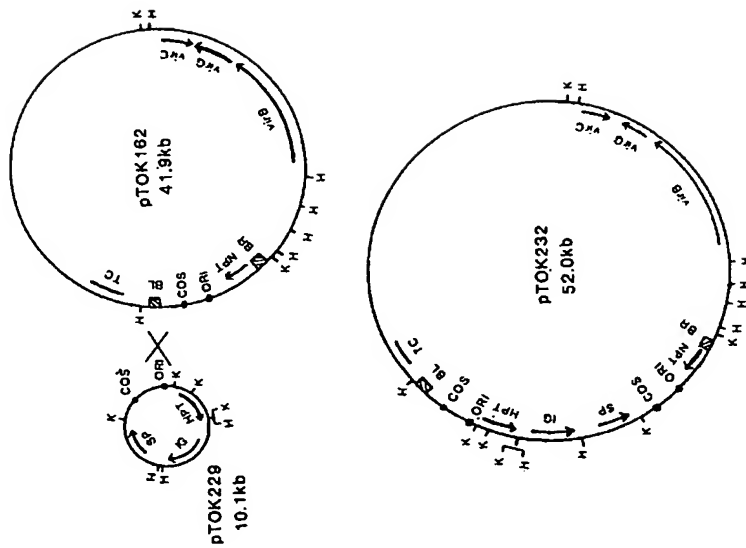
Q5遺伝子の導入効率

系統	菌株	Q5のカルス発/処理カルス数 (%)
A188	1	32/35(91)
A188	1	34/34(100)
A188-Q5S	1	41/48(84)
A188-Q73	1	35/42(83)
A188	2	39/40(98)
A188	2	40/40(100)
A188-Q5S	2	39/40(98)
A188-Q73	2	31/40(78)
B73-A188	2	29/35(83)

BMS: Black Mexican Sweet

菌株1: EHA101(pG121m); 2: LB4404(pT0232)

【第1図】



フロントページの続き

- (56) 参考文献 国際公開91/2071 (WO, A1)
 国際公開92/9696 (WO, A1)
 BIO/TECHNOLOGY, 8
 (1990) P. 33-38
 Proc. Natl. Acad. Sc
 i. USA, 88 (1991) P. 10426-
 10430
 Plant Cell Report
 s, 9 (1990) P. 303-306
 青報, 44 [別1] (1994) P. 52